

09/786130

PCT/JP98/05186

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

EKV

18.11.98

REC'D 15 JAN 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年11月18日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第327914号

出願人
Applicant(s):

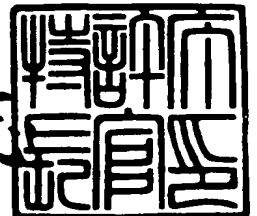
株式会社林原生物化学研究所

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1998年12月25日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山建志



出証番号 出証特平10-3102038

【書類名】 特許願

【整理番号】 10059902

【提出日】 平成10年11月18日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C07K 14/47
C07K 14/54
C07K 14/71
C12N 15/24
C12N 15/12
A61K 38/20
A61K 38/17

【発明の名称】 インターロイキン-18結合蛋白質

【請求項の数】 9

【発明者】

 【住所又は居所】 岡山県倉敷市藤戸町藤戸1343番地の5

 【氏名】 鳥越 角二

【発明者】

 【住所又は居所】 岡山県岡山市三野2丁目12番44号

 【氏名】 谷合 まどか

【発明者】

 【住所又は居所】 岡山県岡山市学南町2丁目7番25号

 【氏名】 栗本 雅司

【特許出願人】

 【識別番号】 000155908

 【郵便番号】 700

 【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

 【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所

 【代表者】 林原 健

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第247588号

【出願日】 平成10年 9月 1日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035736

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インターロイキン-18結合蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表における配列番号1及び2に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含有するインターロイキン-18結合蛋白質。

【請求項2】 部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号3乃至31に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含有する請求項1に記載のインターロイキン-18結合蛋白質。

【請求項3】 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定すると、約40,000乃至60,000ダルトンの分子量を示す請求項1又は2に記載のインターロイキン-18結合蛋白質。

【請求項4】 哺乳類の体液から得ることのできる請求項1、2又は3に記載のインターロイキン-18結合蛋白質。

【請求項5】 請求項1乃至4に記載のインターロイキン-18結合蛋白質をコードするDNA。

【請求項6】 配列表における配列番号32又は33に示すいずれかの塩基配列若しくはその塩基配列に相同的な塩基配列又はそれらの塩基配列に相補的な塩基配列を含有する請求項5に記載のDNA。

【請求項7】 有効成分として、請求項1乃至4に記載のインターロイキン-18結合蛋白質を含有するインターロイキン-18抑制剤。

【請求項8】 有効成分として、請求項1乃至4に記載のインターロイキン-18結合蛋白質を含有する抗感受性疾患剤。

【請求項9】 抗免疫疾患剤としての請求項8に記載の抗感受性疾患剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は新規なサイトカン結合蛋白質、とりわけ、インターロイキン-18結合蛋白質に関する。

【0002】

【従来の技術】

インターロイキン-18（以下、「IL-18」と略記する。）は、免疫系における情報伝達物質であるサイトカインの1種である。特開平8-27189号公報、特開平8-193098号公報及びハルキ・オカムラら『ネイチャー』、第378巻、第6, 552号、88乃至91頁（1995年）に見られるように、IL-18は、発見当初、「インターフェロン- γ 誘導因子（IGIF）」と呼称されていたが、その後、シンペイ・ウシオら『ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー』、第156巻、4, 274乃至4, 279頁（1996年）における提案にしたがって、「IL-18（インターロイキン-18）」と呼称されるようになった。アンガス・ダブリュ・トムソン編『ザ・サイトカイン・ハンドブック』、第3版、アカデミック・プレス・リミテッド発行、465乃至489頁に記載されているように、成熟型のIL-18は157個のアミノ酸からなり、免疫担当細胞において生理活性物質として有用なインターフェロン- γ （以下、「IFN- γ 」と略記する。）の産生を誘導する性質と、キラー細胞の細胞障害性を増強したり、キラー細胞そのものの生成を誘導する性質を兼備している。これらの性質ゆえに、IL-18は抗ウイルス剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、抗免疫疾患剤などの医薬品として広範な用途が期待され、現在、その実用化を目指して鋭意研究が進められている。

【0003】

前述のとおり、IL-18にかぎらず、サイトカインは、本来、免疫系における情報伝達を担う物質として産生され、分泌される。したがって、IL-18が哺乳類の体内で過剰に産生されたり、外部から過剰に投与されたりすると、免疫系のバランスに偏りを生じ、生体にとって有害な免疫反応を惹起する可能性がある。例えば、特開平10-96730号公報などにみられるように、最近の知見は、慢性関節リウマチを含む自己免疫疾患の患者が、IL-18の体液レベルにおいて、健常者より有意に高いことを示している。このことは、IL-18がある種の疾患の発症に直接又は間接に関与していることを物語っている。したがって、斯界においては、IL-18そのものの生理作用の解明や実用化に加えて、IL-18の生理作用を抑制する物質が一刻も早く解明され、実用化されること

が期待されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、IL-18の生理作用を抑制する性質を有し、医薬品としてヒトを含む哺乳類に適用可能な物質を提供することにある。

【0005】

さらに、この発明の第二の課題は、斯かる物質をコードするDNAを提供することにある。

【0006】

加えて、この発明の第三の課題は、斯かる物質のIL-18抑制剤としての用途を提供することにある。

【0007】

さらに加えて、この発明の第四の課題は、斯かる物質の医薬品としての用途を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者がこれらの課題を解決すべく鋭意研究したところ、IL-18に結合することによってその生理作用を抑制する物質が哺乳類の体液中に存在することを突き止めた。本発明者がこの物質を分離し、性質・性状を調べたところ、その本質は蛋白質であり、単離された状態でもIL-18に結合し、その生理作用を顕著に抑制することを見出した。さらに、斯くして存在が確認されたIL-18結合蛋白質は、ヒトを含む哺乳類に投与すると、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー疾患を含む、過剰な免疫反応に起因する諸種の疾患の治療・予防に効果を発揮することも見出した。

【0009】

すなわち、この発明は、前記第一の課題を、配列表における配列番号1及び2に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含有するIL-18結合蛋白質を提供することにより解決するものである。

【0010】

さらに、この発明は、前記第二の課題を、斯かるIL-18結合蛋白質をコードするDNAを提供することにより解決するものである。

【0011】

加えて、この発明は、前記第三の課題を、有効成分として、斯かるIL-18結合蛋白質を含有するIL-18抑制剤を提供することにより解決するものである。

【0012】

さらに加えて、この発明は、前記第四の課題を、有効成分として、斯かるIL-18結合蛋白質を含有する抗感受性疾患剤を提供することにより解決するものである。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、この発明の実施の形態について説明すると、この発明の蛋白質は、IL-18に結合することによってその生理作用を抑制する性質と、独特のアミノ酸配列により特徴付けられる。すなわち、この発明のIL-18結合蛋白質は、IL-18に作用させると、IL-18の代表的な生理作用である、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する作用を抑制する。また、当該IL-18結合蛋白質は、IL-18に結合させると、IL-18の生理作用によるキラー細胞の細胞障害性の増強や、キラー細胞の生成の誘導を抑制する場合がある。この発明のIL-18結合蛋白質は配列表における配列番号1及び2に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含んでなり、例えば、ヒト由来のIL-18結合蛋白質は、部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号3乃至23に示すアミノ酸配列の全部又は一部を、また、マウス由来のIL-18結合蛋白質は配列表における配列番号24乃至31に示すアミノ酸配列の全部又は一部をそれぞれ含有する。この発明のIL-18結合蛋白質は、尿や血液などの体液においては、通常、可溶性糖蛋白質として存在し、還元剤存在下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、「SDS-PAGE」と略記する。）を適用すると、分子量約40,000乃至60,000ダルトンにIL-18結合能を伴う

蛋白質のバンドを示す。

【0014】

この発明の IL-18 結合蛋白質は、斯かる特徴を指標にして、哺乳類の体液や細胞から得ることができる。個々の体液としては、血液、リンパ液、腹腔内液、尿などが挙げられ、また、細胞としては、上皮細胞、内皮細胞、間質細胞、軟骨細胞、単球、顆粒球、リンパ球、神経細胞及びそれらを培養株化して得られる細胞株が挙げられる。経済性を問題にするのであれば、この発明の IL-18 結合蛋白質をコードする DNA に組換え DNA 技術を適用するのが有利である。この発明の IL-18 結合蛋白質をコードする DNA は、配列番号 1 乃至 31 に示すアミノ酸配列に基づき哺乳類の遺伝子を検索することにより得ることができる。例えば、この発明の IL-18 結合蛋白質をコードするヒト由来の DNA は、通常、配列表における配列番号 32 に示す塩基配列の全部又は一部を、また、マウス由来の DNA は、通常、配列表における配列番号 33 に示す塩基配列の全部又は一部をそれぞれ含有する。斯かる DNA により形質転換した動物及び微生物由来の宿主は、常法にしたがって培養することにより、この発明の IL-18 結合蛋白質を高収量で産生する。動物由来の宿主の具体例としては、例えば、3T3 細胞 (ATCC CCL-92)、C127I 細胞 (ATCC CRL-1616)、CHO-K1 細胞 (ATCC CCL-61)、CV-1 細胞 (ATCC CCL-70)、COS-1 細胞 (ATCC CRL-1650)、HeLa 細胞 (ATCC CCL-2)、MOP-8 細胞 (ATCC CRL-1709) 及びそれらの変異株を始めとする、ヒト、サル、マウス及びハムスター由来の上皮系細胞、間質系細胞及び造血系細胞が挙げられる。微生物由来の宿主の具体例としては、例えば、細菌、真菌及び酵母が挙げられる。これらの宿主のうち、動物由来の宿主や酵母は、糖蛋白質としての形態の当該 IL-18 結合蛋白質の産生にとりわけ有用である。

【0015】

上記のごとき給源を用いてこの発明の IL-18 結合蛋白質を調製するには、体液又は細胞若しくは微生物の培養物を、必要に応じて、超音波などにより破碎した後、生理活性蛋白質を精製するための慣用の方法、例えば、塩析、透析、濾

過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などを単独又は組合せて適用すればよい。

【0016】

ところで、免疫系は、本来、有害な異物から生体を防御するためのものであるが、ときとして、その働きゆえに、却って、生体に有害な結果をもたらすことがある。哺乳類に、例えば、皮膚、腎臓、肝臓、心臓、骨髄などの臓器を移植すると、同種異系抗原に対する拒絶反応により、T細胞が活性化され、リンパ球が増殖したり、炎症が生じることがある。症状の程度こそ違え、同様の現象は、例えば、アレルゲンのように、宿主が固有のものと見做さない異種異系抗原が侵入した場合にも観察される。また、自己免疫疾患においては、本来、固有のものと見做されるべき成分がアレルギー反応を惹起する。

【0017】

この発明のIL-18結合蛋白質は、免疫系を活性化するIL-18に結合することによってその生理作用を抑制するIL-18抑制剤として機能するので、ヒトを含む哺乳類に投与すると、上記のごとき免疫反応を抑制することが期待される。したがって、この発明でいう感受性疾患とは、拒絶反応及びアレルギー反応を含む免疫反応一般の亢進に起因する免疫疾患を含み、この発明のIL-18結合蛋白質が直接又は間接に作用して治療及び／又は予防し得るすべての疾患ということになる。個々の感受性疾患としては、例えば、上記のごとき臓器移植に伴う拒絶反応に加えて、活動性慢性肝炎、萎縮性胃炎、自己免疫性溶血性貧血、バセドウ病、ベーチェット症候群、CRST症候群、寒冷凝集素性溶血性貧血、潰瘍性大腸炎、グッドパスチャー症候群、甲状腺機能亢進症、慢性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、若年性糖尿病、白血球減少症、多発性硬化症、重症筋無力症、発作性寒冷血色素尿症、悪性貧血、多発性結節性動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、橋本病、シェーグレン症候群、クローン病、交換性眼炎、進行性全身性硬化症、ウェジナー肉芽腫症、HIV感染症、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、花粉症及びハチ毒ア

レルギーを含む自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患一般が挙げられる。なお、この発明の IL-18 結合蛋白質は、IFN- γ の過剰産生や過剰投与などに起因する敗血症ショックの治療・予防にも有効である。また、生体内において、IL-18 が Fas リガンドの産生を増強したり、逆に、Fas リガンドが IL-18 の細胞からの分泌を誘導する場合があるので、この発明の IL-18 結合蛋白質は、Fas 及び Fas リガンドが関与する免疫疾患一般の治療・予防にも有効である。さらに、この発明の IL-18 結合蛋白質は、例えば、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、中毒性肝炎、劇症肝炎、ウイルス性肝硬変、アルコール性肝硬変、中毒性肝硬変、胆汁性肝硬変、脂肪肝、肝臓腫瘍及び肝血管障害などの肝疾患、胆管炎、胆嚢炎、原発性硬化性胆管炎、胆嚢腫瘍及び胆管腫瘍などの胆嚢・胆道疾患、急性膵炎、慢性膵炎、膵機能不全、膵臓腫瘍及び膵嚢胞などの膵疾患の治療・予防、さらには、それらの疾患に伴う、例えば、食欲不振、倦怠感、疲労感、腹痛、背痛、黄疸、発熱、肝性脳症、腹水、出血傾向などの肝機能障害及び肝機能不全を緩和又は解消する効果もある。その際、例えば、プロトポルフィリン、チオプリン、マロチラート、肝臓加水分解物、グリチルリチン、ジクロロ酢酸ジイソプロピルアミン、メチルメチオニンスルホニウムクロリド、グルタチオン、タウリン、シアニダノール、インターフェロン、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、チオクト酸、小紫胡湯、大紫胡湯、紫胡桂枝湯、アスパラギン酸、甘草、メチオニン、チオプリン、グリチルリチンなどの肝細胞の機能を促進する薬剤を併用してもよい。加えて、この発明の IL-18 結合蛋白質は、虚血、虚血性心筋症、脳虚血、脳底動脈片頭痛、脳底部異常血管網症、脳卒中、脳底部動脈瘤、動脈硬、血管内皮障害、糖尿病、腸管膜血管閉塞症及び上腸管膜動脈症候群を含む循環器系疾患、パーキンソン病、脊髄筋肉萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、痴呆症、脳血管性痴呆症、エイズ痴呆症及び脳脊髄炎を含む神経系疾患の症状を緩和したり、予防する効果もある。斯くして、有効成分として IL-18 結合蛋白質を含有するこの発明の抗感受性疾患剤は、ヒトをはじめとする哺乳動物における上記のごとき感受性疾患を治療・予防するための抗自己免疫疾患剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、抗腫瘍剤、免疫抑制剤、増血剤、白血球増多剤、血小板増多剤、鎮痛剤、解

熱剤、肝機能改善剤などとして多種多様な用途を有することとなる。剤型並びに感受性疾患の種類及び症状にもよるが、この発明の感受性疾患剤は、通常、液状、懸濁状、ペースト状又は固状に調製され、この発明のIL-18結合蛋白質を0.00001乃至100% (w/w)、望ましくは、0.0001乃至20% (w/w) 含んでなる。

【0018】

この発明の抗感受性疾患剤は、IL-18結合蛋白質単独の形態はもとより、IL-18結合蛋白質とそれ以外の生理的に許容される、例えば、補助剤、増量剤、希釈剤、賦形剤、安定剤、防腐剤、免疫助成剤、着色剤、着香剤、さらには、必要に応じて、他の生理活性物質の1又は複数との組成物としての形態をも包含する。安定剤としては、例えば、血清アルブミンやゼラチンなどの蛋白質、グルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、マルチトール、マンニトール、ラクチトールなどの糖質及びクエン酸塩、磷酸塩若しくは炭酸塩を主体とする緩衝剤が、また、併用し得る他の生理活性物質としては、例えば、アスピリン、フルフェナム酸、メフェナム酸、ジクロフェナック、インドメタシン、トルメチン、イブプロフェン、ケトプロフェン、フェニルブタゾン、オキシフェンブタゾン、消炎酵素剤、金製剤、クロロキン製剤などの抗炎症剤、FK506、シクロフォスファミド、アザチオプリン、メトトレキサート、サイクロスポリンA、副腎皮質ホルモンなどの免疫抑制剤、さらには、IL-18及びIL-18以外のサイトカインの受容体アンタゴニスト、例えば、インターロイキン-1受容体蛋白質、インターロイキン-2受容体蛋白質、インターロイキン-5受容体蛋白質、インターロイキン-6受容体蛋白質、インターロイキン-8受容体蛋白質、インターロイキン-12受容体蛋白質及びIL-18受容体蛋白質に対する、ヒト化抗体を含むそれぞれの抗体や、TNF- α 受容体、TNF- β 受容体、インターロイキン-1受容体、インターロイキン-5受容体、インターロイキン-8受容体及びIL-18受容体に対するそれぞれのアンタゴニスト、さらには、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-5、インターロイキン-8、インターロイキン-6、インターロイキン-8、インターロイキン-12及びインターロイキン-18に対する、

ヒト化抗体を含むそれぞれの抗体が挙げられる。

【0019】

さらに、この発明の抗感受性疾患剤は、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、IL-18結合蛋白質を、例えば、1回当りの用量又はその整数倍（4倍まで）若しくはその約数（1/40まで）に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、エキス剤、エリキシル剤、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、眼軟膏剤、懸濁剤、乳剤、硬膏剤、坐剤、散剤、酒精剤、錠剤、シロップ剤、浸剤、煎剤、注射剤、補輸液、チンキ剤、点眼剤、トローチ剤、軟膏剤、パップ剤、芳香水剤、リニメント剤、リモナーデ剤、流エキス剤及びローション剤が挙げられ、必要に応じて、点鼻剤、鼻噴霧剤、下気道吸入剤、眼科用除法剤、口腔粘膜貼付剤及び浣腸剤としてもよい。この発明の抗感受性疾患剤は経口的に投与しても非経口的に投与してもよく、いずれの場合にも、感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。感受性疾患の種類や症状にもよるが、具体的には、患者の症状や投与後の経過を観察しながら、成人当たり約 $1\mu\text{g}$ /回乃至 1g /回、通常、約 $10\mu\text{g}$ /回乃至 100mg /回のIL-18結合蛋白質を1乃至4回/日又は1乃至5回/週の用量で1日乃至半年に亘って経口投与するか、あるいは、皮内、皮下、筋肉内又は静脈内に非経口投与すればよい。

【0020】

ところで、この発明のIL-18結合蛋白質をコードするDNAは、いわゆる、「遺伝子療法」にも有用である。すなわち、通常の遺伝子療法においては、この発明のDNAを、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルス由来のベクターに挿入するか、カチオニックポリマーや膜融合型リポソームなどのリポソームに包埋し、この状態でIL-18結合蛋白質に感受性を有する疾患に罹患した患者に直接注入するか、あるいは、患者からリンパ球を採取し、生体外で導入した後、患者に自家移植するのである。斯くして、この発明のDNAは、例えば、自己免疫疾患やアレルギー性疾患などの免疫疾患や、肝機能障害及び神経系疾患を含む各種疾患の遺伝子療法、さらには、臓器移植に伴う拒絶反応や過剰な免疫反応の抑制に著効を発揮することとなる。なお、

これらの遺伝子療法を実施するための一般的手順は、例えば、島田隆、斉藤泉、小澤敏也編集、『実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ 遺伝子治療の基礎技術』、1996年、羊土社発行にも詳述されている。

【0021】

以下、実施例に沿ってこの発明の実施の形態を説明するが、斯界の技術水準においては、斯かる実施例は多種多様に改変可能である。斯かる技術水準に鑑み、この発明がこれらの実施例のみに限定されないことは言うまでもない。なお、この発明による蛋白質のIL-18結合能は、後記実施例においては、次の結合アッセイにより決定される阻害率を指標にして判定した。

【0022】

すなわち、IL-18受容体をコードするDNAをチャイニーズハムスター卵巣由来のCHO-K1細胞(ATCC CRL-9618)に導入することによって、IL-18受容体が細胞表面に過剰に発現した効果細胞を調製する。別途、0.1% (w/v) アジ化ナトリウム、0.1% (v/v) ウシ血清アルブミン及び100mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸をそれぞれ含むRPMI-1640培地(pH7.2)を調製し、これをアッセイ用培地とする。次いで、試験区として、アッセイ用培地により適宜希釈した被検試料を50 μ lとり、これにアッセイ用培地により適宜希釈した¹²⁵I標識IL-18を50 μ l加え、4℃で1時間振盪した後、アッセイ用培地に細胞密度 1×10^7 個/mlになるように浮遊させた効果細胞を50 μ l加え、4℃でさらに1時間振盪する。その後、1.5ml容遠心管にジブチルフタレート/ジオクチルフタレート混液(容積比1:1)を200 μ lとり、その上部に効果細胞の浮遊液を重層し、4℃で5分間遠心分離し、吸引により上清を除去した後、細胞残渣を遠心管ごと切り取り、ガンマカウンター(商品名『ARC-300型』、アロカ株式会社製造)により放射能強度を測定する。併行して、¹²⁵I標識IL-18とともに未標識IL-18を5 μ g加える系(非特異的結合区)と、被検試料のみ省略する系(総結合区)をそれぞれ設け、これらを試験区と同様に処置する。そして、試験区、総結合区及び非特異的吸着区において得られた放射能強度を数1に示す式にそれぞれ代入して阻害率(%)を計算した。

【0023】

【数1】

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{\text{総結合区} - \text{試験区}}{\text{総結合区} - \text{非特異的結合区}} \times 100$$

【0024】

【実施例1】

〈ヒト由来のIL-18結合蛋白質〉

【0025】

【実施例1-1】

〈IL-18結合蛋白質の調製〉

人尿31を膜濃縮した後、20mM磷酸緩衝液（pH7.0）に対して4℃で20時間透析した。透析内液を採取し、これをあらかじめ20mM磷酸緩衝液（pH7.0）により平衡化しておいたアフィニティークロマトグラフィー用ゲル（商品名『ウイト・ジャーム・レクチン・セファロース6MB』、アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会社販売）230mlのカラムに負荷してIL-18結合蛋白質を吸着せしめ、カラムを20mM磷酸緩衝液（pH7.0）により洗浄した後、0.5M N-アセチル-D-グルコサミンを含有する20mM磷酸緩衝液（pH7.0）を通液しつつ、カラムからの溶出液を一定量ずつ採取した。

【0026】

各溶出画分のIL-18結合能を前記結合アッセイにより調べた後、IL-18結合能が認められた画分を合一し、20mM磷酸緩衝液（pH7.0）に対して4℃で16時間透析した。透析内液を採取し、適宜濃縮した後、あらかじめ20mM磷酸緩衝液（pH7.0）により平衡化しておいたイオン交換クロマトグラフィー用ゲル（商品名『TSK-gel DEAE-5PW』、東ソー株式会社製造）54mlのカラムに負荷し、塩化ナトリウムの濃度が100分間で0Mから0.5Mまで直線的に上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下にて20mM磷酸緩衝液（pH7.0）を2ml／分の流速で通液し、塩化ナトリウム濃度が0

2M付近で溶出した画分を採取した。

【0027】

この画分を膜濃縮した後、あらかじめ20mM磷酸-食塩緩衝液（以下、「PBS」という。）により平衡化しておいたゲル濾過クロマトグラフィー用ゲル（商品名『HiLoad Superdex 200』、アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会社販売）120mlのカラムに負荷し、カラムにPBSを通液しつつ、ゲル濾過クロマトグラフィーにおける分子量が70,000ダルトン付近の画分を採取した。この新たに得られた画分をあらかじめ0.1%（v/v）トリフルオロ酢酸水溶液により平衡化しておいた逆相クロマトグラフィー用ゲル（商品名『Vydac 214TP54』、サイプレス・インターナショナル株式会社販売）4mlに負荷し、アセトニトリル濃度が0%（v/v）から90%（v/v）まで直線的に上昇するアセトニトリルの濃度勾配下にてカラムに0.1%（v/v）トリフルオロ酢酸水溶液を通液しつつ、カラムからの溶出液を一定量ずつ分画した。各溶出画分のIL-18結合能を前記結合アッセイにより調べた後、IL-18結合能が確認された、アセトニトリル濃度が70%（v/v）付近で溶出した画分を採取し、濃縮したところ、ヒト由来の精製IL-18結合蛋白質が約3 μ g得られた。

【0028】

その後、この精製IL-18結合蛋白質につき、ジチオトレイトール存在下のSDS-PAGEにより分子量を測定したところ、約40,000乃至60,000ダルトンにIL-18結合能を伴う蛋白質の単一バンドが観察された。また、大麦胚芽レクチンをリガンドとする『ウィート・ジャーム・レクチン・セファロース6MB』に吸着することは、本例のIL-18結合蛋白質が糖蛋白質であることを示している。

【0029】

【実施例1-2】

〈N末端アミノ酸配列〉

実施例1-1の方法により得た精製IL-18結合蛋白質を遠心濃縮機により乾固した後、8M尿素及び10mM EDTAをそれぞれ含有する0.1Mトリ

スー塩酸緩衝液（pH 8.1）に溶解し、窒素気流下、50℃で30分間処理した。次いで、ジチオトレイトールを適量加え、窒素気流下、50℃で2時間還元した後、反応物にモノヨード酢酸を適量加え、室温下、暗所にて30分間反応させてIL-18結合蛋白質をアルキル化した。

【0030】

得られたアルキル化物にジチオトレイトール存在下のSDS-PAGEを適用することによって分子量約40,000乃至60,000ダルトンに相当する蛋白質を分離し、以後、常法にしたがって、分離したIL-18結合蛋白質のバンドをPVDF膜へ転写後、その膜をプロテインシーケンサー（商品名『473A型』、アプライド・バイオシステムズ社製造）を用いるアミノ酸分析に供してN末端アミノ酸配列を決定した。その結果、実施例1-1の方法により得たこの発明のIL-18結合蛋白質は、N末端アミノ酸配列として、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を含有していることが判明した（なお、「Xaa」は未同定のアミノ酸であることを意味している）。

【0031】

【実施例1-3】

＜ペプチドマッピング＞

ウルフ・ヘルマンら『アナリティカル・バイオケミストリー』、第224巻、451乃至455頁（1995年）に記載された『イン・ゲル・ダイジェクション法』により、実施例1-2の方法により還元アルキル化したIL-18結合蛋白質のトリプシン消化後及びトリプシン／ペプシン消化後のペプチドマップをそれぞれ作成するとともに、トリプシン消化により得られたペプチド断片1乃至8及びトリプシン／ペプシン消化により得られたペプチド断片9乃至20のアミノ酸配列をそれぞれ決定した。その結果、ペプチド断片1乃至20は、それぞれ、配列表における配列番号4乃至23に示すアミノ酸配列を有していることが判明した（なお、「Xaa」は未同定のアミノ酸であることを意味している）。このとき得られたペプチドマップを図1に示す。

【0032】

【実施例1-4】

〈IL-18抑制作用〉

免疫担当細胞及びIL-18として、それぞれ、健常者のリンパ球及び組換え型ヒトIL-18を、また、IFN- γ の標準品として米国国立衛生研究所から入手した標準ヒトIFN- γ (Gg02-901-530) をそれぞれ用いた以外は、後記実施例3-3におけると同様に試験した。

【0033】

その結果、本例のIL-18結合蛋白質が共存すると、ヒトIL-18によるIFN- γ 産生の誘導が有意に抑制された。このことは、本例のIL-18結合蛋白質がIL-18の生理作用を抑制することを示している。

【0034】

【実施例2】

〈ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNA〉

【0035】

【実施例2-1】

〈ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNA〉

【0036】

【実施例2-1(a)】

〈ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNAの塩基配列〉

ポリ(A)付加ヒト肝臓RNA (クローンテック製) 10 ngに10×PCR緩衝液2 μ l、25 mM塩化マグネシウム2 μ l、0.1 Mジチオトレイトール2 μ l、25 mM dNTPミックス1 μ l、200単位/ μ l逆転写酵素(商品名『スーパースクリプトII』、ライフテック・オリエンタル株式会社製造) 1 μ l及び2.5 μ Mランダムヘキサマー1 μ lをそれぞれ加え、滅菌蒸留水で全量を20 μ lとした。この混合物を0.5 ml容反応管にとり、42℃で50分間、70℃で15分間、この順序で、それぞれインキュベートすることによって逆転写酵素反応させ、第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0037】

この反応物に体積比で2.5倍量のエタノールと3 M酢酸ナトリウム2 μ lをそれぞれ加え、-20℃で2時間静置してcDNAを沈澱させた。沈澱を採取し

、75% (v/v) 水性エタノールにより洗浄した後、滅菌蒸留水に溶解し、2.5 単位/ μ l DNAポリメラーゼ (商品名『クローンD P f uポリメラーゼ』、ストラタジーン製造) 0.5 μ l、専用緩衝液10 μ l及び25 mM dNTPミックス1 μ lをそれぞれ加え、さらに、センスプライマーとして、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-ACNCCNGTNWSNCA-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドと、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号8に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-TGNGCNARNACNACRTG-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ10 μ M加え、滅菌蒸留水で全量を100 μ lとした。この混合物を94℃、40℃及び72℃で、この順序で、それぞれ1分間インキュベートするサイクルを40回繰返してPCR反応させた。

【0038】

次いで、PCR産物の一部をとり、常法にしたがって、1% (w/v) アガロースゲル上で電気泳動することによってDNA断片を分画し、ナイロン膜に転写し、0.4 N水酸化ナトリウムにより固定し、2×SSCにより洗浄し、風乾した後、6×SSPE、5×デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100 μ g/ml 変性サケ精子DNAをそれぞれ含有するプレハイブリダイゼーション液に浸漬し、65℃で3時間インキュベートした。別途、常法にしたがって、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列に基づき5'-GGRCANGGRTCYTT-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、これを [γ -³²P] ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼにより同位体標識することによってプローブを調製した。前記ナイロン膜を浸漬したプレハイブリダイゼーション液にこのプローブを1 pmo l加え、ナイロン膜を40℃でさらに20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた。その後、6×SSCによりナイロン膜を洗浄し、常法にしたがってオートラジオグラフィした。その結果、プローブの特異的なハイブリダイゼーションを示すシグナルが認められ、上記PCR産物が目的とするDNA断片を含むことが確認された。

【0039】

その後、残りのPCR産物にプラスミドベクター (商品名『pCR-Scr i

p t C a m S K (+)』、ストラタジーン社製造)を1 n g 加え、DNAライゲーション・キット(商品名『DNAライゲーション・キット/バージョン2』、宝酒造株式会社製造)を用いてプラスミドベクター内にPCR産物であるDNA断片を挿入した。反応物の一部をとり、大腸菌株(商品名『X L 1 - B l u e M R F ' K a n』、ストラタジーン社製造)を形質転換した後、形質転換体をクロラムフェニコール30 μ g / m l を含むLB培地(p H 7. 5)に接種し、37℃で18時間培養し、培養物から菌体を採取し、これを常法にしたがって処理してプラスミドDNAを採取した。ジデオキシ法により調べたところ、このプラスミドDNAは、PCR産物のDNA断片の塩基配列として、配列表における配列番号34に示す塩基配列を含んでいた。その塩基配列がコードする、配列表における配列番号34に併記したアミノ酸配列と、配列表における配列番号3乃至23に示す、実施例1-2乃至1-3で決定した部分アミノ酸配列とを照合したところ、これらの部分アミノ酸配列は、いずれもその全部又は一部が配列番号34に併記したアミノ酸配列に含まれていた。このことは、配列表における配列番号34に示す塩基配列が、ヒト由来の当該I L - 18結合蛋白質の少なくとも一部分をコードするものであることを示唆している。

【0040】

【実施例2-1(b)】

〈ヒト由来のI L - 18結合蛋白質をコードするDNAの塩基配列〉

ポリ(A)付加ヒト肝臓RNA(クローンテック製)10 n gを、市販の5' RACEキット(商品名『5' RACEシステム、バージョン2.0』、ギブコ・ビー・アール・エル製)を用いて、PCRの一変法である5' RACEに供した。すなわち、まず、上記RNAを、配列表における配列番号34に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-GGTCACTTCCAATGCTGGACA-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる逆転写酵素反応に供し、引き続いてターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼを作用させて、生成した第一ストランドcDNAの5'末端にCテイルを付加した。この第一ストランドcDNAを、次に、センスプライマーとして、上記キットに添付の5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGI

IGGGIIGGGIIG-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドと、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号34に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-GTCCTTTGTGCTTCTAACTGA-3'を用いてPCR反応させた。以上の5'RACEで得られた反応産物を一部とり、常法にしたがい1%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供したところ、特定のDNA断片の増幅が確認された。実施例2-1(a)におけると同様にして塩基配列を調べたところ、このDNA断片は、配列表における配列番号35に示す塩基配列を含有していた。この塩基配列における第160乃至216番目の塩基からなる配列は、実施例2-1(a)で決定した、配列表の配列番号34に示す塩基配列における第1乃至57番目の塩基からなる配列と完全に一致した。このことは、配列表における配列番号35に示す塩基配列が、配列番号34に示す、ヒト由来の当該IL-18結合蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列とオーバーラップし、かつ、その5'末端側上流域に相当する塩基配列を含んでいることを示唆している。

【0041】

【実施例2-1(c)】

〈ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNAの塩基配列〉

ポリ(A)付加ヒト肝臓RNA(クローンテック製)10ngを、斎藤隆監訳、『PCR実験マニュアル』、HBJ出版発行(1991年)、25乃至33に記載の方法にしたがって、PCRの一変法である3'RACEに供した。すなわち、先ず、上記RNAを、5'-GACTCGAGTCGACATCGA(T)₁₇-3'で表される塩基配列のヌクレオチドをプライマーとして用いる逆転写酵素反応に供し、得られた第一ストランドcDNAを、実施例2-1(a)で決定した、配列表における配列番号34に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-TTCTCCTGTGTGCTCGTGGA-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーとして、5'-GACTCGAGTCGACATCG-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマーとして用いてPCR反応させた。以上の3'RACEで得られた反応産物を一部とり、常法にしたがい1%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供したところ

、特定のDNA断片の増幅が確認された。実施例2-1(a)におけると同様にして塩基配列を調べたところ、このDNA断片は、配列表における配列番号36に示す塩基配列を含有していた。この塩基配列における第1乃至60番目の塩基からなる配列は、実施例2-1(a)で決定した、配列表の配列番号34に示す塩基配列における第352乃至411番目の塩基からなる配列と完全に一致した。このことは、配列表における配列番号36に示す塩基配列が、配列番号34に示す、ヒト由来の当該IL-18結合蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列とオーバーラップし、かつ、その3'末端側下流域に相当する塩基配列を含んでいることを示唆している。

【0042】

以上に示したように、実施例2-1(a)乃至2-1(c)で、ヒト由来の当該IL-18結合蛋白質をコードする、互いにオーバーラップする塩基配列として、配列表における配列番号34乃至36に示す塩基配列を決定した。互いにオーバーラップする部分の塩基配列を勘案すると、これらの塩基配列は、配列表における配列番号37に示す一連の塩基配列に由来する部分配列と考えられた。

【0043】

【実施例2-1(d)】

〈ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNAの塩基配列〉

実施例2-1(a)の方法にしたがって、ポリ(A)付加ヒト肝臓RNAを逆転写酵素反応させた後、センスプライマーとして、配列表における配列番号37に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-TG TGTGACTGGAGAAAGAGGAC-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号37に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-TACAGGCAGTCAGGGACTGTTCACCTCCAG-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いたこと以外は、実施例2-1(b)におけると同様にしてPCR反応させた。このPCR産物の一部をとり、常法にしたがい1%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供したところ、特定のDNA断片の増幅が確認された。引き続き、実施例2-1(a)におけると同様にして塩基配列を調べたところ、このDNA断片は、配列表にお

ける配列番号 37 に示す塩基配列を有していた。これにより、実施例 2-1 (a) 乃至 2-1 (c) で決定した、配列表における配列番号 34 乃至 36 に示す塩基配列が、配列番号 37 に示す一連の塩基配列の、それぞれ部分配列であることが裏付けられた。

【0044】

一方、配列表における配列番号 37 に示す塩基配列によりコードされる、そこに併記したアミノ酸配列と、配列表における配列番号 4 乃至 23 に示す、実施例 1-3 で決定した部分アミノ酸配列とを照合したところ、これらの部分アミノ酸配列は、すべて配列番号 37 に併記したアミノ酸配列における第 1 乃至 164 番目のアミノ酸からなる部分に含まれていた。また、配列表における配列番号 3 に示す、実施例 1-2 で決定した N 末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号 37 に併記したアミノ酸配列における第 1 乃至 22 番目のアミノ酸からなる配列とよく一致した。したがって、以上のことは、配列表の配列番号 37 に示す塩基配列における第 160 乃至 651 番目の塩基からなる配列がヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得るものであり、そして、当該 IL-18 結合蛋白質が、全体としては、斯かる塩基配列に併記した第 1 乃至 164 番目のアミノ酸からなる配列を有する場合があることを示唆している。なお、以上のごとく示唆された、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質のアミノ酸配列とそれをコードする塩基配列は、配列表における配列番号 1 及び 32 にそれぞれ別記している。

【0045】

【実施例 2-2】

〈形質転換体によるヒト由来の IL-18 結合蛋白質の産生〉

【0046】

【実施例 2-2 (a)】

〈組換え DNA の調製〉

0.5 ml 反応管に、実施例 2-1 (d) の方法で得た、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得る DNA を 1 ng とり、これに、10 µl の 10 × PCR 緩衝液、1 µl の 25 mM dNTP ミックス及び 2.5 単位/µl DNA ポリメラーゼ (商品名『クローンド Pfu ポリメラーゼ』、ストラタジー

ン製造)を加え、センスプライマーとして、配列表における配列番号32に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-CTCGAGGCCACCATGACCA TGAGACACAAC-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号32に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-GCGGCCGCTCATTAGTGATGGT GATGGTGATGACCCTGCTGCTGTGGACT-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ適量加えて、滅菌蒸留水で全量を100 μ lとした。この混合物を、94℃で1分間、42℃で2分間及び72℃で3分間インキュベートするサイクルを3回繰返した後、さらに94℃で1分間、60℃で2分間及び72℃で3分間インキュベートするサイクルを35回繰返してPCR反応させた。実施例2-1(a)におけると同様にしてPCR産物中に目的とするDNA断片が存在することを確認する一方、実施例2-1(a)におけると同様にして当該DNA断片を挿入してなるプラスミドベクターを採取した。引き続き実施例2-1(a)におけると同様にして塩基配列を調べ、このプラスミドDNAが、配列表における配列番号32に示す塩基配列を含むことを確認した。

【0047】

常法にしたがって、上記で得たプラスミドDNAに制限酵素XhoI及びNotIを作用させて得たDNA断片100ngに、エス・ミズシマら、『ニュークレイック・アシッド・リサーチ』、第17号、第18巻、5、332頁(1990年)に記載された方法に準じて調製し、予め制限酵素XhoI及びNotIで切断しておいたプラスミドベクター『pEF-BOS』を10ng加え、DNAライゲーション・キット(商品名『DNAライゲーション・キット/バージョン2』、宝酒造株式会社製造)を用いてプラスミドベクター内にDNA断片を挿入した。実施例2-1(a)におけると同様にして、ライゲーション反応産物で大腸菌株を形質転換し、得られた形質転換体から組換えDNAを採取し、この組換えDNAを『pEFH18BPH6』と命名した。常法にしたがって分析したところ、図3に示すように、組換えDNA『pEFH18BPH6』においては、ヒト由来の当該IL-18結合蛋白質をコードし得る、配列表における配列番号

32に示す塩基配列を含有するcDNA『EFH18BPH6 cDNA』が、延長因子1プロモーター『EF1 α P』の下流に連結されていた。

【0048】

【実施例2-2(b)】

〈形質転換体によるヒト由来のIL-18結合蛋白質の産生〉

実施例2-2(a)で得た、組換えDNA『pEFH18BPH6』を含む形質転換大腸菌株を、100 μ g/ml アンピシリンを含むLB培地(pH7.2)に接種し、37℃で18時間通気攪拌培養した後、培養物から常法にしたがいプラスミドDNAを採取して、組換えDNA『pEFH18BPH6』を得た。この組換えDNAを20 μ gとり、予め常法にしたがい増殖させておいた、 1×10^7 個のアフリカミドリザルの腎臓由来の繊維芽細胞株COS-1細胞(ATCC CRL-1650)に、エレクトロポレーション法により導入して、この発明のDNAが導入された形質転換体を得た。

【0049】

平底培養瓶に培地(商品名『ASF104』、味の素製)をとり、これに、上記で得た形質転換体を 1×10^5 個/mlの割合で接種し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で3日間培養した。培養物から培養上清を採取し、アフィニティークロマトグラフィー用ゲル(商品名『Ni-NTA』、キアジェン製)のカラムに負荷した。このカラムに、20mMイミダゾールを含むPBSを通液して非吸着画分を除去した後、250mMイミダゾールを含むPBSを通液し、カラムからの溶出液を一定量ずつ分画採取した。それぞれの画分におけるIL-18結合蛋白質の有無を前記結合アッセイにより調べ、当該蛋白質の存在の確認された画分を採取し、合一して、 1×10^7 個の当該形質転換体より、約2mlの精製IL-18結合蛋白質の水溶液を得た。この水溶液の蛋白質含量は約10 μ g/mlであった。この水溶液を、実施例1-2の方法にしたがって処理し、N末端アミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号3と同一のアミノ酸配列が得られた。なお、対照として、組換えDNA『pEFH18BPH6』に代えてプラスミドベクター『pEF-BOS』を用いて、本実施例と同様に処置したところ、IL-18結合蛋白質の存在は確認されなかった。以上の結果は、

ヒト由来の当該IL-18結合蛋白質が配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有する場合があります、そして、当該蛋白質が、配列番号32に示す塩基配列によりコードされ得ることを裏付けている。

【0050】

【実施例3】

〈マウス由来のIL-18結合蛋白質〉

【0051】

【実施例3-1】

〈IL-18結合蛋白質の調製〉

コリネバクテリウム・パルバム(ATCC11827)を60℃で1時間加熱して得た死菌体を8週齢の雌CD-1マウス600匹の腹腔内に1mg/匹の割合で注射投与し、通常の方法で7日間飼育した後、静脈内に大腸菌由来の精製リポ多糖を1μg/匹の割合で注射投与した。2時間後、マウスの心臓から血液を採取し、これを常法にしたがって処理して血清200mlを得た。その後、この血清を実施例1-1の方法により精製したところ、マウス由来の精製IL-18結合蛋白質が約3μg得られた。

【0052】

その後、この精製IL-18結合蛋白質につき、ジチオトレイトール存在下のSDS-PAGEにより分子量を測定したところ、約40,000乃至60,000ダルトンにIL-18結合能を伴う蛋白質の単一バンドが観察された。なお、大麦胚芽レクチンをリガンドとする『ウィート・ジャーム・レクチン・セファロース6MB』に吸着することは、本例のIL-18結合蛋白質が糖蛋白質であることを示している。

【0053】

【実施例3-2】

〈ペプチドマッピング〉

実施例3-1の方法により得た精製IL-18結合蛋白質につき、実施例1-3におけると同様にしてペプチドマップを作成するとともに、トリプシン消化により得られたペプチド断片1乃至5及びトリプシン/ペプシン消化により得られ

たペプチド断片6乃至8のアミノ酸配列を調べたところ、ペプチド断片1乃至8は、それぞれ、配列表における配列番号24乃至31に示すアミノ酸配列を有していた（なお、「Xaa」は未同定のアミノ酸であることを意味している）。このとき得られたペプチドマップを図2に示す。

【0054】

【実施例3-3】

〈IL-18抑制作用〉

14週齢の雌C3H/HeJマウスから脾臓を摘出し、分散し、付着細胞を除去した後、脾細胞を10%（v/v）ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地（pH7.4）に細胞密度 1×10^7 個/mlになるように浮遊させ、免疫担当細胞とした。次いで、脾細胞及び $2.5 \mu\text{g/ml}$ コンカナバリンAをマイクロプレートにそれぞれ0.15ml/ウェル及び0.05mlずつ分注し、組換え型マウスIL-18を 25 ng/ml と、IL-18に対して過剰量の、実施例3-1の方法により得た精製IL-18結合蛋白質とを含む新鮮な同一培地を0.05ml/ウェル加えた後、5%CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を0.1mlずつ採取し、産生したIFN- γ を通常の酵素免疫法により測定した。併行して、IL-18結合蛋白質及びマウスIL-18のいずれかを省略した系をそれぞれ設け、これを上記と同様に処置して対照とした。なお、IFN- γ の標準品には、米国国立衛生研究所から入手した標準マウスIFN- γ （Gg02-901-533）を用い、国際単位（IU）に換算して表示した。

【0055】

その結果、IL-18結合蛋白質を省略した対照におけるIFN- γ の産生量が約600IU/mlであり、また、マウスIL-18を省略した対照におけるIFN- γ の産生量が0IU/mlであったのに対して、IL-18結合蛋白質を加えた系においては、僅かに60IU/ml前後であった。このことは、本例のIL-18結合蛋白質がIL-18の生理作用を抑制することを示している。

【0056】

【実施例4】

<マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNA>

【0057】

【実施例4-1】

<マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNA>

【0058】

【実施例4-1(a)】

<マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNAの塩基配列>

コリネバクテリウム・パルバム(ATCC11827)を60℃で1時間加熱し、得られた死菌体を8週齢の雌CD-1マウスの腹腔内に1mg/匹の割合で注射投与した。7日間飼育した後、静脈内に大腸菌由来の精製リボ多糖を1μg/匹の割合で注射投与し、2時間後、頸椎を脱臼させて屠殺し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓を湿重で3gとり、これを6Mグアニジンイソチオシアナート、10mMクエン酸ナトリウム及び0.5%(w/v)SDSからなる混液(pH7.0)20mlに浸漬し、ホモゲナイザーにより破碎した。次いで、35ml容遠心管に5.7M塩化セシウムを含有する0.1MEDTA(pH7.5)を25mlずつ注入し、その上部に細胞破碎物を10mlずつ重層し、この状態で20℃、25,000rpmで20時間超遠心分離した。その後、RNA画分を採取し、これを15ml容遠心管にとり、等量のクロロホルム/イソブタノール混液(体積比4:1)を加え、5分間振盪し、4℃、10,000rpmでさらに10分間遠心分離した後、水層部を採取した。採取した水層に2.5倍容のエタノールを加え、-20℃で2時間静置することによって全RNAを沈澱させた後、沈澱を採取し、75%(v/v)水性エタノールで洗浄し、滅菌蒸留水0.5mlに溶解した。

【0059】

以後、この全RNAを実施例2-1(a)におけると同様にして逆転写酵素反応させ、得られた第一ストランドcDNAを含む反応物を、センスプライマーとして、配列表における配列番号27に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-GCNGTNCNACNAA-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号30

に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-GTYTTNARNCCRTC-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いた以外は実施例2-1(a)におけると同様にしてPCR反応させた。その後、プローブの調製に、配列表における配列番号24に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-SWNGTRRTGNCCYTCYTT-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを用いた以外は、実施例2におけると同様にしてPCR産物中に目的とするDNA断片が存在することを確認する一方、実施例2-1(a)におけると同様にして当該DNA断片の塩基配列を調べたところ、当該DNA断片は配列表における配列番号38に示す塩基配列を有していた。配列表における配列番号38に併記したアミノ酸配列と、配列表における配列番号24乃至31に示す、実施例3-2で決定した部分アミノ酸配列とを照合したところ、これらの部分アミノ酸配列は、いずれもその全部又は一部が配列番号38に併記したアミノ酸配列に含まれていた。このことは、配列表における配列番号38に示す塩基配列が、マウス由来の当該IL-18結合蛋白質の少なくとも一部分をコードするものであることを示唆している。

【0060】

【実施例4-1(b)】

〈マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNAの塩基配列〉

実施例4-1(a)の方法にしたがって、コリネバクテリウム・パルバムの死菌体トリポリ糖で処理した雌性CD-1マウスより採取した全RNA1μgを、市販の5'RACEキット(商品名『5'RACEシステム、バージョン2.0』、ギブコ・ビー・アール・エル製)を用いて、PCRの一変法である5'RACEに供した。すなわち、まず、上記全RNAを、配列表における配列番号38に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-TGCAGGCAGTACAGGACAAGG-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる逆転写酵素反応に供し、引き続いてターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼを作用させて、生成した第一ストランドcDNAの5'末端にCテイルを付加した。この第一ストランドcDNAを、次に、センスプライマーとして、上記キットに添付の5'-GGCCACGCGTCGACTAGT

ACGGG I IGGG I IGGG I I G-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドと、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 38 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-GTGCTGGGTACTGCTTAGTTG-3' とを用いて PCR 反応させた。以上の 5' RACE で得られた反応産物を一部とり、常法にしたがい 1% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供したところ、特定の DNA 断片の増幅が確認された。実施例 2-1 (a) におけると同様にして塩基配列を調べたところ、この DNA 断片は、配列表における配列番号 39 に示す塩基配列を含有していた。この塩基配列における第 307 乃至 336 番目の塩基からなる配列は、実施例 4-1 (a) で決定した、配列表の配列番号 38 に示す塩基配列における第 1 乃至 30 番目の塩基からなる配列と完全に一致した。このことは、配列表における配列番号 39 に示す塩基配列が、配列番号 38 に示す、マウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列とオーバーラップし、かつ、その 5' 末端側上流域に相当する塩基配列を含んでいることを示唆している。

【0061】

【実施例 4-1 (c)】

〈マウス由来の IL-18 結合蛋白質をコードする DNA の塩基配列〉

実施例 4-1 (a) の方法にしたがって、コリネバクテリウム・パルバムの死菌体トリポ多糖で処理した雌性 CD-1 マウスより採取した全 RNA 1 μ g を、斎藤隆監訳、『PCR 実験マニュアル』、HBJ 出版発行 (1991 年)、25 乃至 33 に記載の方法にしたがって、PCR の一変法である 3' RACE に供した。すなわち、先ず、上記 RNA を、5'-GACTCGAGTCGACATCGA (T)₁₇-3' で表される塩基配列のヌクレオチドをプライマーとして用いる逆転写酵素反応に供し、得られた第一ストランド cDNA を、実施例 4-1 (a) で決定した、配列表における配列番号 38 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-GATCCTGGACAAGTGGCC-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーとして、5'-GACTCGAGTCGACATCG-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマーとして用いて PCR 反応させた。以上の 3' RACE で得られた反応産

物を一部とり、常法にしたがい1% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供したところ、特異的なDNA断片の増幅が確認された。実施例2-1(a)におけると同様にして塩基配列を調べたところ、このDNA断片は、配列表における配列番号40に示す塩基配列を含有していた。この塩基配列における第1乃至63番目の塩基からなる配列は、実施例4-1(a)で決定した、配列表の配列番号38に示す塩基配列における第289乃至351番目の塩基からなる配列と完全に一致した。このことは、配列表における配列番号40に示す塩基配列が、配列番号38に示す、マウス由来の当該IL-18結合蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列とオーバーラップし、かつ、その3'末端側下流域に相当する塩基配列を含んでいることを示唆している。

【0062】

以上に示したように、実施例4-1(a)乃至4-1(c)で、マウス由来の当該IL-18結合蛋白質をコードする、互いにオーバーラップする塩基配列として、配列表における配列番号38乃至40に示す塩基配列を決定した。互いにオーバーラップする部分の塩基配列を勘案すると、これらの塩基配列は、配列表における配列番号41に示す一連の塩基配列に由来する部分配列と考えられた。

【0063】

【実施例4-1(d)】

〈マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNAの塩基配列〉

実施例4-1(a)の方法にしたがって、コリネバクテリウム・パルバムの死菌体とり多糖で処理した雌性CD-1マウスより採取した全RNAを逆転写酵素反応させた後、センスプライマーとして、配列表における配列番号41に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-CTGAGCCTTAGAGCTCCAA G-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号41に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-GTGAAGCTTGAGTTTGAGGTTC-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いたこと以外は、実施例4-1(c)におけると同様にしてPCR反応させた。このPCR産物の一部をとり、常法にしたがい1% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供したところ、特異的なDNA

断片の増幅が確認された。引き続き、実施例 2-1 (a) におけると同様にして塩基配列を調べたところ、この DNA 断片は、配列表における配列番号 41 に示す塩基配列を有していた。これにより、実施例 4-1 (a) 乃至 4-1 (c) で決定した、配列表における配列番号 38 乃至 40 に示す塩基配列が、配列番号 41 に示す一連の塩基配列の、それぞれ部分配列であることが裏付けられた。

【0064】

一方、配列表における配列番号 41 に示す塩基配列によりコードされる、そこに併記したアミノ酸配列と、配列表における配列番号 24 乃至 31 に示す、実施例 3-2 で決定した部分アミノ酸配列とを照合したところ、これらの部分アミノ酸配列は、すべて配列番号 41 に併記したアミノ酸配列における第 1 乃至 165 番目のアミノ酸からなる部分に含まれていた。また、配列表における配列番号 1 に示す、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質のアミノ酸配列は、配列表における配列番号 41 に併記したアミノ酸配列における第 1 乃至 165 番目のアミノ酸からなる配列と約 61% の相同性を示した。したがって、以上のことは、配列表の配列番号 41 に示す塩基配列における第 235 乃至 729 番目の塩基からなる配列がマウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得るものであり、そして、当該 IL-18 結合蛋白質が、全体としては、斯かる塩基配列に併記した第 1 乃至 165 番目のアミノ酸からなる配列を有する場合があることを示唆している。なお、以上のごとく示唆された、マウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質のアミノ酸配列とそれをコードする塩基配列は、配列表における配列番号 2 及び 3 にそれぞれ別記している。

【0065】

【実施例 4-2】

〈形質転換体によるマウス由来の IL-18 結合蛋白質の産生〉

【0066】

【実施例 4-2 (a)】

〈組換え DNA の調製〉

0.5 ml 反応管に、実施例 4-1 (d) の方法で得た、マウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得る DNA を 1 ng とり、これを、配列表におけ

る配列番号 33 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-CTCGACGCC ACCATGACCATGAGACACTGC-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーとして、また、配列表における配列番号 33 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-GCGGCCGCTCATTAGT GATGGTGATGGTGATGTGCAACCCCTGGGGCCTGC-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマーとして用いたこと以外は実施例 2-2 (a) におけると同様に処置して PCR 反応させた。実施例 4-1 (a) におけると同様にして PCR 産物中に目的とする DNA 断片が存在することを確認する一方、当該 DNA 断片を挿入してなるプラスミドベクターを採取した。引き続き実施例 2-1 (a) におけると同様にして塩基配列を調べ、このプラスミド DNA が、配列表における配列番号 33 に示す塩基配列を含むことを確認した。

【0067】

上記で得たプラスミド DNA を、実施例 2-2 (a) におけると同様にしてプラスミドベクター『pEF-BOS』に挿入して組換え DNA とし、得られた組換え DNA を『pEFM18BPH-MK2』と命名した。常法にしたがって分析したところ、図 4 に示すように、組換え DNA『pEFM18BPH-MK2』においては、マウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得る、配列表における配列番号 33 に示す塩基配列を含有する cDNA『EFM18BPH-MK2 cDNA』が、延長因子 1 プロモーター『EF1 α P』の下流に連結されていた。

【0068】

【実施例 4-2 (b)】

＜形質転換体によるマウス由来の IL-18 結合蛋白質の産生＞

実施例 4-2 (a) で得た組換え DNA『pEFM18BPH-MK2』を含む形質転換大腸菌株の培養物より、常法にしたがいプラスミド DNA を採取して、組換え DNA『pEFM18BPH-MK2』を得た。この組換え DNA を 20 μ g とり、実施例 2-2 (b) におけると同様にして COS-1 細胞 (ATCC CRL-1650) に導入して、この発明の DNA が導入された形質転換体

を得た。

【0069】

引き続き実施例 2-2 (b) におけると同様にして、上記で得た形質転換体を培養し、培養物から培養上清を採取し、アフィニティークロマトグラフィー用ゲル（商品名『Ni-NTA』、キアジェン製）のカラムを用いてこの培養上清を分画し、IL-18 結合蛋白質の存在が確認された画分を採取・合一し、 1×10^7 個の上記形質転換体より約 2 ml の、精製 IL-18 結合蛋白質を含む水溶液を得た。この水溶液の蛋白質含量は約 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。この水溶液を、実施例 1-2 の方法にしたがって処理し、N 末端アミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 2 における N 末端部分のものと同一のアミノ酸配列が得られた。なお、対照として、組換え DNA『pEFH18BPH6』に代えてプラスミドベクター『pEF-BOS』を用いて、本実施例と同様に処置したところ、IL-18 結合蛋白質の存在は確認されなかった。以上の結果は、マウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質が配列表における配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する場合があります、そして、当該蛋白質が、配列番号 33 に示す塩基配列によりコードされ得ることを裏付けている。

【0070】

以下、この発明の IL-18 結合蛋白質を有効成分として含有する感受性疾患剤の実施例を具体的に説明する。

【0071】

【実施例 5】

〈液剤〉

安定剤としてパイロジェン除去した結晶性トレハロース粉末（商品名『トレハオース』、株式会社林原商事販売）を 1% (w/v) 含む生理食塩水に実施例 1-1 又は実施例 2-2 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質を $1 \text{ mg}/\text{ml}$ になるように溶解した後、常法にしたがって除菌して、2 種類の液剤を得た。

【0072】

安定性に優れた本品は、いずれも、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための注射剤、点眼剤、点鼻剤などと

して有用である。

【0073】

【実施例 6】

〈乾燥注射剤〉

安定剤としてパイロジェン除去したシュクロースを 1% (w/v) 含む生理食塩水 100 ml に実施例 1-1 又は実施例 2-2 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質を 100 mg 溶解し、それぞれ、常法にしたがって除菌した後、バイアル瓶に 1 ml ずつ分注し、凍結乾燥し、密栓した。

【0074】

安定性に優れた本品は、いずれも、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための乾燥注射剤として有用である。

【0075】

【実施例 7】

〈軟膏剤〉

滅菌蒸留水にカルボキシビニルポリマー（商品名『ハイビスワコー』、和光純薬工業株式会社製造）及びパイロジェンを除去した結晶性トレハロース粉末（商品名『トレハオース』、株式会社林原商事販売）をそれぞれ濃度 1.4% (w/w) 及び 2.0% (w/w) になるように溶解し、実施例 1-1 又は実施例 2-2 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質を均一に混合した後、pH 7.2 に調整して、1 g 当り IL-18 結合蛋白質を約 1 mg 含む 2 種類のペースト状物を得た。

【0076】

延展性と安定性に優れた本品は、いずれも、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための軟膏剤として有用である。

【0077】

【実施例 8】

〈錠剤〉

パイロジェンを除去した無水結晶 α -マルトース粉末（商品名『ファイントー

ス』、株式会社林原商事販売)に実施例1-1又は実施例2-2の方法により得た精製IL-18結合蛋白質及び細胞賦活剤としてのルミンを均一に混合し、得られた混合物を常法にしたがって打錠して、製品1錠(約200mg)当りIL-18結合蛋白質及びルミン(日本感光色素株式会社製)をそれぞれ約1mg含む2種類の錠剤を得た。

【0078】

摂取性、安定性に優れ、細胞賦活作用も兼備する本品は、いずれも、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための錠剤として有用である。

【0079】

【実験】

〈急性毒性試験〉

常法にしたがって、5週齢のd d yマウス(体重20乃至25g)に実施例1-1、2-2、3-1及び4-2の方法により得た精製IL-18結合蛋白質を経口投与するか、腹腔内又は静脈内に注射投与した。その結果、これらの精製IL-18結合蛋白質のLD50は、いずれの投与経路によっても、約1mg/マウス1匹体重以上であった。ことことは、この発明のIL-18結合蛋白質がヒトを含む哺乳類に投与する医薬品に配合して安全であることを物語っている。

【0080】

【発明の効果】

以上説明したとおり、この発明はIL-18に結合する新規な蛋白質の発見に基づくものである。この発明の蛋白質は、ヒトを含む哺乳類において、免疫系を活性化するIL-18の生理作用を抑制する性質を有するので、臓器移植に伴う拒絶反応の緩和や、過剰な免疫反応に起因する種々の疾患の治療・予防に著効を発揮する。

【0081】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：164

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列

Thr	Pro	Val	Ser	Gln	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala	Ser	Val	Arg	Ser
1				5				10						15	
Thr	Lys	Asp	Pro	Cys	Pro	Ser	Gln	Pro	Pro	Val	Phe	Pro	Ala	Ala	Lys
			20					25						30	
Gln	Cys	Pro	Ala	Leu	Glu	Val	Thr	Trp	Pro	Glu	Val	Glu	Val	Pro	Leu
			35					40						45	
Asn	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Cys	Ser	Arg	Phe	Pro	Asn
	50						55					60			
Phe	Ser	Ile	Leu	Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Ile	Glu	His	Leu
	65					70					75			80	
Pro	Gly	Arg	Leu	Trp	Glu	Gly	Ser	Thr	Ser	Arg	Glu	Arg	Gly	Ser	Thr
						85				90				95	
Gly	Thr	Gln	Leu	Cys	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Pro	Ala
			100						105					110	
Leu	His	Ser	Thr	Asn	Phe	Ser	Cys	Val	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Gln	Val
			115						120					125	
Val	Gln	Arg	His	Val	Val	Leu	Ala	Gln	Leu	Trp	Ala	Gly	Leu	Arg	Ala
			130					135						140	
Thr	Leu	Pro	Pro	Thr	Gln	Glu	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Pro
	145							150						155	
															160
Gln	Gln	Gln	Gly												

【0082】

配列番号：2

配列の長さ：165

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列

Thr	Ser	Ala	Pr	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Val	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Asp	Pro	Cys	Ser	Ser	Trp	Ser	Pro	Ala	Val	Pro	Thr	Lys	Gln	Tyr	Pro
			20					25					30		
Ala	Leu	Asp	Val	Ile	Trp	Pro	Glu	Lys	Glu	Val	Pro	Leu	Asn	Gly	Thr
		35					40					45			
Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Cys	Ser	Arg	Phe	Pro	Tyr	Phe	Ser	Ile
	50					55					60				
Leu	Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Ile	Glu	His	Leu	Pro	Gly	Arg
65				70						75				80	
Leu	Lys	Glu	Gly	His	Thr	Ser	Arg	Glu	His	Arg	Asn	Thr	Ser	Thr	Trp
			85						90					95	
Leu	His	Arg	Ala	Leu	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Pro	Thr	Leu	Arg	Ser
		100							105				110		
Thr	Asn	Phe	Ser	Cys	Leu	Phe	Val	Asp	Pro	Gly	Gln	Val	Ala	Gln	Tyr
		115							120				125		
His	Ile	Ile	Leu	Ala	Gln	Leu	Trp	Asp	Gly	Leu	Lys	Thr	Ala	Pro	Ser
	130					135					140				
Pro	Ser	Gln	Glu	Thr	Leu	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Val	Ser	Arg	Ser	Ala
145					150					155				160	
Gly	Pro	Gly	Val	Ala											
					165										

【0083】

配列番号 : 3

配列の長さ : 22

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : N末端フラグメント

配列

Thr Pr Val Ser Gln Xaa Xaa Xaa Ala Ala Xaa Ala Xaa Val Arg Xaa

1

5

10

15

Xaa Lys Asp Pro Cys Pro

20

【0084】

配列番号：4

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu Cys Lys

1

5

【0085】

配列番号：5

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu Cys Lys

1

5

10

【0086】

配列番号：6

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg

1 5

【0087】

配列番号：7

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Thr Pro Val Ser Gln Xaa Xaa Xaa Ala Ala Xaa Ala Xaa Val Arg

1 5 10 15

【0088】

配列番号：8

配列の長さ：23

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Xaa Leu Pro

1 5 10 15

Xaa Xaa Gln Glu Ala Leu Pro

20

【0089】

配列番号：9

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Xaa Xaa Ala

1 5 10

【0090】

配列番号：10

配列の長さ：29

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Xaa Xaa Xaa Phe

1 5 10 15

Xaa Xaa Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg

20 25

【0091】

配列番号：11

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Gln Cys Pro Ala Xaa Glu Val Thr Trp Xaa Glu Val

1 5 10

【0092】

配列番号：12

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg

1 5

【0093】

配列番号 : 13

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Leu Val Asp Pro Glu Gln

1 5

【0094】

配列番号 : 14

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Ile Glu His Leu Pro Gly Arg

1 5

【0095】

配列番号 : 15

配列の長さ : 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

His Val Val Leu

1

【0096】

配列番号：16

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu

1

5

【0097】

配列番号：17

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu

1

5

【0098】

配列番号：18

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Tyr Xaa Leu Gly Xaa Gly

1

5

【0099】

配列番号 : 19

配列の長さ : 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Phe Pro Asn Phe

1

【0100】

配列番号 : 20

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Tyr Xaa Leu Gly Xaa Gly Xaa Phe

1

5

【0101】

配列番号 : 21

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Glu Val Thr Xaa Xaa Glu Val

1

5

【0102】

配列番号 : 22

配列の長さ : 8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Tyr Xaa Leu Gly Xaa Gly Xaa Phe

1 5

【0103】

配列番号：23

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Xaa Xaa Val Ala Xaa Xaa Arg Phe Pro Asn Phe

1 5 10

【0104】

配列番号：24

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg

1 5

【0105】

配列番号：25

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Glu His Arg Xaa Thr Ser Thr Trp Leu His Arg

1 5 10

【0106】

配列番号：26

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Glu His Arg Xaa Thr Ser Thr Xaa Leu His

1 5 10

【0107】

配列番号：27

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Val Pro Thr Lys

1 5 10

【0108】

配列番号：28

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ala Leu Val Leu Glu Glu Leu Ser Pro Thr Leu Arg

1 5 10

【0109】

配列番号 : 29

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Ile Glu His Leu Pro Gly Arg

1 5

【0110】

配列番号 : 30

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Xaa Asp Gly Leu Lys Thr

1 5

【0111】

配列番号 : 31

配列の長さ : 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

His Ile Ile Leu

1

【0112】

配列番号 : 32

配列の長さ : 492

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴

起源

生物名 : ヒト

組織の種類 : 肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号 : mat peptide

存在位置 : 1..492

特徴を決定した方法 : E

配列

ACA CCT GTC TCG CAG ACC ACC ACA GCT GCC ACT GCC TCA GTT AGA AGC	48
Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser	
1 5 10 15	
ACA AAG GAC CCC TGC CCC TCC CAG CCC CCA GTG TTC CCA GCA GCT AAG	96
Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys	
20 25 30	
CAG TGT CCA GCA TTG GAA GTG ACC TGG CCA GAG GTG GAA GTG CCA CTG	144
Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu	
35 40 45	
AAT GGA ACG CTG AGC TTA TCC TGT GTG GCC TGC AGC CGC TTC CCC AAC	192
Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn	
50 55 60	
TTC AGC ATC CTC TAC TGG CTG GGC AAT GGT TCC TTC ATT GAG CAC CTC	240

[illegible]

【0 1 1 3】

配列番号：33

配列の長さ : 495

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

組織の種類：肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号：mat peptide

存在位置：1..495

特徴を決定した方法：E

配列

ACA TCT GCA CCT CAG ACA ACT GCC ACT GTC TTA ACT GGA AGC TCA AAA	48
Thr Ser Ala Pro Gln Thr Thr Ala Thr Val Leu Thr Gly Ser Ser Lys	
1 5 10 15	
GAC CCA TGC TCT TCC TGG TCT CCA GCA GTC CCA ACT AAG CAG TAC CCA	96
Asp Pro Cys Ser Ser Trp Ser Pro Ala Val Pro Thr Lys Gln Tyr Pro	
20 25 30	
GCA CTG GAT GTG ATT TGG CCA GAA AAA GAA GTG CCA CTG AAT GGA ACT	144
Ala Leu Asp Val Ile Trp Pro Glu Lys Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr	
35 40 45	
CTG ACC TTG TCC TGT ACT GCC TGC AGC CGC TTC CCC TAC TTC AGC ATC	192
Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Cys Ser Arg Phe Pro Tyr Phe Ser Ile	
50 55 60	
CTC TAC TGG CTG GGC AAT GGT TCC TTC ATT GAG CAC CTT CCA GGC CGG	240
Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg	
65 70 75 80	
CTG AAG GAG GGC CAC ACA AGT CGC GAG CAC AGG AAC ACA AGC ACC TGG	288
Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg Glu His Arg Asn Thr Ser Thr Trp	
85 90 95	
CTG CAC AGG GCC TTG GTG CTG GAA GAA CTG AGC CCC ACC CTA CGA AGT	336
Leu His Arg Ala Leu Val Leu Glu Glu Leu Ser Pro Thr Leu Arg Ser	
100 105 110	
ACC AAC TTC TCC TGT TTG TTT GTG GAT CCT GGA CAA GTG GCC CAG TAT	384
Thr Asn Phe Ser Cys Leu Phe Val Asp Pro Gly Gln Val Ala Gln Tyr	

165

配列番号：34

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の特徴

生物名：ヒト

配列

47

Gln Cys Pr	Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu	
35	40	45
AAT GGA ACG CTG AGC TTA TCC TGT GTG GCC TGC AGC CGC TTC CCC AAC		192
Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn		
50	55	60
TTC AGC ATC CTC TAC TGG CTG GGC AAT GGT TCC TTC ATT GAG CAC CTC		240
Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu		
65	70	75
CCA GGC CGA CTG TGG GAG GGG AGC ACC AGC CGG GAA CGT GGG AGC ACA		288
Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr		
	85	90
GGT ACG CAG CTG TGC AAG GCC TTG GTG CTG GAG CAG CTG ACC CCT GCC		336
Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala		
100	105	110
CTG CAC AGC ACC AAC TTC TCC TGT GTG CTC GTG GAC CCT GAA CAG GTT		384
Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val		
115	120	125
GTC CAG CGT CAC GTC GTC CTG GCC CAG		411
Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln		
130	135	

【 0 1 1 5 】

配列番号 : 35

配列の長さ : 216

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴

起源

生物名：ヒト

組織の種類：肝臓

配列

```

TGTGTGACTG GAGAAGAGGA CGTTGTCACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGCTCCTGAC   60
GCATGCATC ATG ACC ATG AGA CAC AAC TGG ACA CCA GAC CTC AGC CCT TTG   111
      Met Thr Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu
            1             5             10
TGG GTC CTG CTC CTG TGT GCC CAC GTC GTC ACT CTC CTG GTC AGA GCC   159
Trp Val Leu Leu Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala
      15             20             25             30
ACA CCT GTC TCG CAG ACC ACC ACA GCT GCC ACT GCC TCA GTT AGA AGC   207
Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser
            35             40             45
ACA AAG GAC   216
Thr Lys Asp

```

【0116】

配列番号：36

配列の長さ：234

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴

起源

生物名：ヒト

組織の種類：肝臓

配列

```

TTC TCC TGT GTG CTC GTG GAC CCT GAA CAG GTT GTC CAG CGT CAC GTC   48
Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pr  Glu Gln Val Val Gln Arg His Val

```

1	5	10	15	
GTC CTG GCC CAG CTC TGG GCT GGG CTG AGG GCA ACC TTG CCC CCC ACC	96			
Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro Thr				
20	25	30		
CAA GAA GCC CTG CCC TCC AGC CAC AGC AGT CCA CAG CAG CAG GGT	141			
Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly				
35	40	45		
TAAGACTCAG CACAGGGCCA GCAGCAGCAC AACCTTGACC AGAGCTTGGG TCCTACCTGT	201			
CTACCTGGAG TGAACAGTCC CTGACTGCCT GTA	234			

【 0 1 1 7 】

配列番号 : 37

配列の長さ : 744

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴

起源

生物名 : ヒト

組織の種類 : 肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号 : mat peptide

存在位置 : 160..651

特徴を決定した方法 : E

配列

TGTGTGACTG GAGAAGAGGA CGTTGTCACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGCTCCTGAC	60
GCATGCATC ATG ACC ATG AGA CAC AAC TGG ACA CCA GAC CTC AGC CCT TTG	111

Met Thr Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu

-30

-25

-20

特平 1 0 — 3 2 7 9 1 4

TGG GTC CTG CTC CTG TGT GCC CAC GTC GTC ACT CTC CTG GTC AGA GCC	159
Trp Val Leu Leu Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala	
-15 -10 -5	
ACA CCT GTC TCG CAG ACC ACC ACA GCT GCC ACT GCC TCA GTT AGA AGC	207
Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser	
1 5 10 15	
ACA AAG GAC CCC TGC CCC TCC CAG CCC CCA GTG TTC CCA GCA GCT AAG	255
Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys	
20 25 30	
CAG TGT CCA GCA TTG GAA GTG ACC TGG CCA GAG GTG GAA GTG CCA CTG	303
Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu	
35 40 45	
AAT GGA ACG CTG AGC TTA TCC TGT GTG GCC TGC AGC CGC TTC CCC AAC	351
Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn	
50 55 60	
TTC AGC ATC CTC TAC TGG CTG GGC AAT GGT TCC TTC ATT GAG CAC CTC	399
Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu	
65 70 75 80	
CCA GGC CGA CTG TGG GAG GGG AGC ACC AGC CGG GAA CGT GGG AGC ACA	447
Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr	
85 90 95	
GGT ACG CAG CTG TGC AAG GCC TTG GTG CTG GAG CAG CTG ACC CCT GCC	495
Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala	
100 105 110	
CTG CAC AGC ACC AAC TTC TCC TGT GTG CTC GTG GAC CCT GAA CAG GTT	543
Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pr Glu Gln Val	
115 120 125	
GTC CAG CGT CAC GTC GTC CTG GCC CAG CTC TGG GCT GGG CTG AGG GCA	591
Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala	

130	135	140	
ACC TTG CCC CCC ACC CAA GAA GCC CTG CCC TCC AGC CAC AGC AGT CCA			639
Thr Leu Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro			
145	150	155	160
CAG CAG CAG GGT TAAGACTCAG CACAGGGCCA GCAGCAGCAC AACCTTGACC			691
Gln Gln Gln Gly			
AGAGCTTGGG TCCTACCTGT CTACCTGGAG TGAACAGTCC CTGACTGCCT GTA			744

【0118】

配列番号 : 38

配列の長さ : 351

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴

起源

生物名 : マウス

組織の種類 : 肝臓

配列

GCA GTC CCA ACT AAG CAG TAC CCA GCA CTG GAT GTG ATT TGG CCA GAA	48
Ala Val Pro Thr Lys Gln Tyr Pro Ala Leu Asp Val Ile Trp Pro Glu	
1 5 10 15	
AAA GAA GTG CCA CTG AAT GGA ACT CTG ACC TTG TCC TGT ACT GCC TGC	96
Lys Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Cys	
20 25 30	
AGC CGC TTC CCC TAC TTC AGC ATC CTC TAC TGG CTG GGC AAT GGT TCC	144
Ser Arg Phe Pro Tyr Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser	
35 40 45	
TTC ATT GAG CAC CTT CCA GGC CGG CTG AAG GAG GGC CAC ACA AGT CGC	192

Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg
50 55 60
GAG CAC AGG AAC ACA AGC ACC TGG CTG CAC AGG GCC TTG GTG CTG GAA 240
Glu His Arg Asn Thr Ser Thr Trp Leu His Arg Ala Leu Val Leu Glu
65 70 75 80
GAA CTG AGC CCC ACC CTA CGA AGT ACC AAC TTC TCC TGT TTG TTT GTG 288
Glu Leu Ser Pro Thr Leu Arg Ser Thr Asn Phe Ser Cys Leu Phe Val
85 90 95
GAT CCT GGA CAA GTG GCC CAG TAT CAC ATC ATT CTG GCC CAG CTC TGG 336
Asp Pro Gly Gln Val Ala Gln Tyr His Ile Ile Leu Ala Gln Leu Trp
100 105 110
GAT GGG TTG AAG ACA 351
Asp Gly Leu Lys Thr

115

【0119】

配列番号 : 39

配列の長さ : 336

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴

起源

生物名 : マウス

組織の種類 : 肝臓

配列

CTGAGCCTTA GAGCTCCAAG AAGCTATTCG GGGCTTAGGA GCCAGAAGCT GACTGCTGCC 60
TGCCCTTCCC AGAAGGAGGC TGGCAAGCTG GCAAACGGAC TGTTGCTTCC CAGAGGAAGT 120
CACAGACACC AGACTTGCTT GCAAGTCATC ATG ACC ATG AGA CAC TGC TGG ACA 174

Met Thr Met Arg His Cys Trp Thr

1

5

GCA GGC CCC AGT TCT TGG TGG GTC CTG CTT TTG TAT GTC CAT GTC ATT 222

Ala Gly Pro Ser Ser Trp Trp Val Leu Leu Leu Tyr Val His Val Ile

10

15

20

TTG GCC AGA GCC ACA TCT GCA CCT CAG ACA ACT GCC ACT GTC TTA ACT 270

Leu Ala Arg Ala Thr Ser Ala Pro Gln Thr Thr Ala Thr Val Leu Thr

25

30

35

40

GGA AGC TCA AAA GAC CCA TGC TCT TCC TGG TCT CCA GCA GTC CCA ACT 318

Gly Ser Ser Lys Asp Pro Cys Ser Ser Trp Ser Pro Ala Val Pro Thr

45

50

55

AAG CAG TAC CCA GCA CTG

336

Lys Gln Tyr Pro Ala Leu

60

【 0 1 2 0 】

配列番号 : 40

配列の長さ : 253

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴

起源

生物名 : マウス

組織の種類 : 肝臓

配列

GAT CCT GGA CAA GTG GCC CAG TAT CAC ATC ATT CTG GCC CAG CTC TGG 48

Asp Pr Gly Gln Val Ala Gln Tyr His Ile Ile Leu Ala Gln Leu Trp

1

5

10

15

GAT GGG TTG AAG ACA GCT CCG TCC CCT TCT CAA GAA ACC CTC TCT AGC 96
 Asp Gly Leu Lys Thr Ala Pro Ser Pro Ser Gln Glu Thr Leu Ser Ser
 20 25 30
 CAC AGC CCA GTA TCC AGA TCA GCA GGC CCA GGG GTT GCA TAAAGCCAAC 145
 His Ser Pro Val Ser Arg Ser Ala Gly Pro Gly Val Ala
 35 40 45
 CACACCATGA CCTTGACCAG AGCCTGGCTC TCATCTACCT GGAGGGTGGG GTCTACACCA 205
 TAGGCTGTGA TTGCCTTTCT GCTGCTGAAC CTCAAACCTCA AGCTTCAC 253

【0121】

配列番号：41

配列の長さ：847

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

組織の種類：肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号：mat peptide

存在位置：235..729

特徴を決定した方法：E

配列

CTGAGCCTTA GAGCTCCAAG AAGCTATTCG GGGCTTAGGA GCCAGAAGCT GACTGCTGCC 60
 TGCCCTTCCC AGAAGGAGGC TGGCAAGCTG GCAAACGGAC TGTGCTTCC CAGAGGAAGT 120
 CACAGACACC AGACTTGCTT GCAAGTCATC ATG ACC ATG AGA CAC TGC TGG ACA 174
 Met Thr Met Arg His Cys Trp Thr

GCA GGC CCC AGT TCT TGG TGG GTC CTG CTT TTG TAT GTC CAT GTC ATT	222
Ala Gly Pro Ser Ser Trp Trp Val Leu Leu Leu Tyr Val His Val Ile	
-20 -15 -10 -5	
TTG GCC AGA GCC ACA TCT GCA CCT CAG ACA ACT GCC ACT GTC TTA ACT	270
Leu Ala Arg Ala Thr Ser Ala Pro Gln Thr Thr Ala Thr Val Leu Thr	
1 5 10	
GGA AGC TCA AAA GAC CCA TGC TCT TCC TGG TCT CCA GCA GTC CCA ACT	318
Gly Ser Ser Lys Asp Pro Cys Ser Ser Trp Ser Pro Ala Val Pro Thr	
15 20 25	
AAG CAG TAC CCA GCA CTG GAT GTG ATT TGG CCA GAA AAA GAA GTG CCA	366
Lys Gln Tyr Pro Ala Leu Asp Val Ile Trp Pro Glu Lys Glu Val Pro	
30 35 40	
CTG AAT GGA ACT CTG ACC TTG TCC TGT ACT GCC TGC AGC CGC TTC CCC	414
Leu Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Cys Ser Arg Phe Pro	
45 50 55 60	
TAC TTC AGC ATC CTC TAC TGG CTG GGC AAT GGT TCC TTC ATT GAG CAC	462
Tyr Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His	
65 70 75	
CTT CCA GGC CGG CTG AAG GAG GGC CAC ACA AGT CGC GAG CAC AGG AAC	510
Leu Pro Gly Arg Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg Glu His Arg Asn	
80 85 90	
ACA AGC ACC TGG CTG CAC AGG GCC TTG GTG CTG GAA GAA CTG AGC CCC	558
Thr Ser Thr Trp Leu His Arg Ala Leu Val Leu Glu Glu Leu Ser Pro	
95 100 105	
ACC CTA CGA AGT ACC AAC TTC TCC TGT TTG TTT GTG GAT CCT GGA CAA	606
Thr Leu Arg Ser Thr Asn Phe Ser Cys Leu Phe Val Asp Pro Gly Gln	
110 115 120	
GTG GCC CAG TAT CAC ATC ATT CTG GCC CAG CTC TGG GAT GGG TTG AAG	654
Val Ala Gln Tyr His Ile Ile Leu Ala Gln Leu Trp Asp Gly Leu Lys	

125	130	135	140	
ACA GCT CCG TCC CCT TCT CAA GAA ACC CTC TCT AGC CAC AGC CCA GTA	702			
Thr Ala Pro Ser Pro Ser Gln Glu Thr Leu Ser Ser His Ser Pro Val				
	145	150	155	
TCC AGA TCA GCA GGC CCA GGG GTT GCA TAAAGCCAAC CACACCATGA	749			
Ser Arg Ser Ala Gly Pro Gly Val Ala				
	160	165		
CCTTGACCAG AGCCTGGCTC TCATCTACCT GGAGGGTGA GTCTACACCA TAGGCTGTGA	809			
TTGCCTTTCT GCTGCTGAAC CTCAAACTCA AGCTTCAC	847			

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ヒト由来の IL-18 結合蛋白質のペプチドマップである。

【図 2】

マウス由来の IL-18 結合蛋白質のペプチドマップである。

【図 3】

ヒト由来の IL-18 結合蛋白質をコードする塩基配列を含む組換え DNA の構造を示す制限酵素地図である。

【図 4】

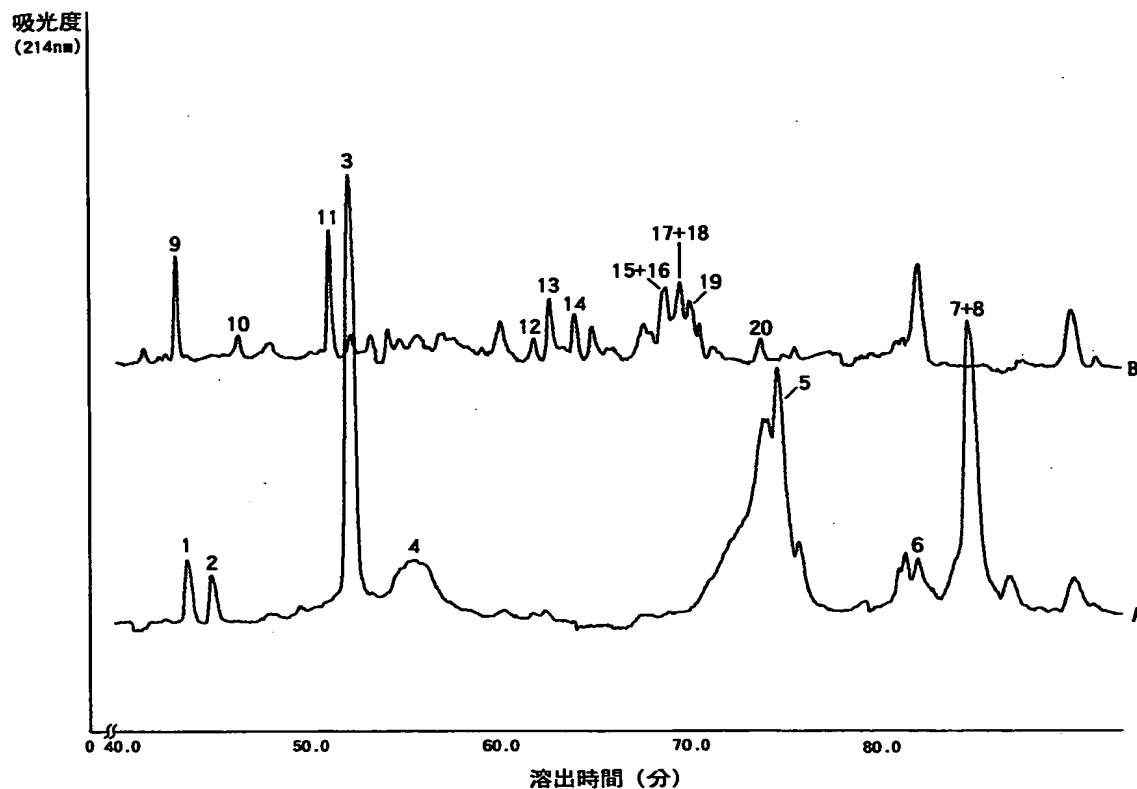
マウス由来の IL-18 結合蛋白質をコードする塩基配列を含む組換え DNA の構造を示す制限酵素地図である。

【符号の説明】

EFH18BPH6 cDNA	ヒト由来の IL-18 結合蛋白質をコードする塩基配列を含む cDNA
EFM18BPH-MK2 cDNA	マウス由来の IL-18 結合蛋白質をコードする塩基配列を含む cDNA
EF1αP	延長因子 1 プロモーター
Amp	アンピシリン耐性遺伝子
ori	複製起点

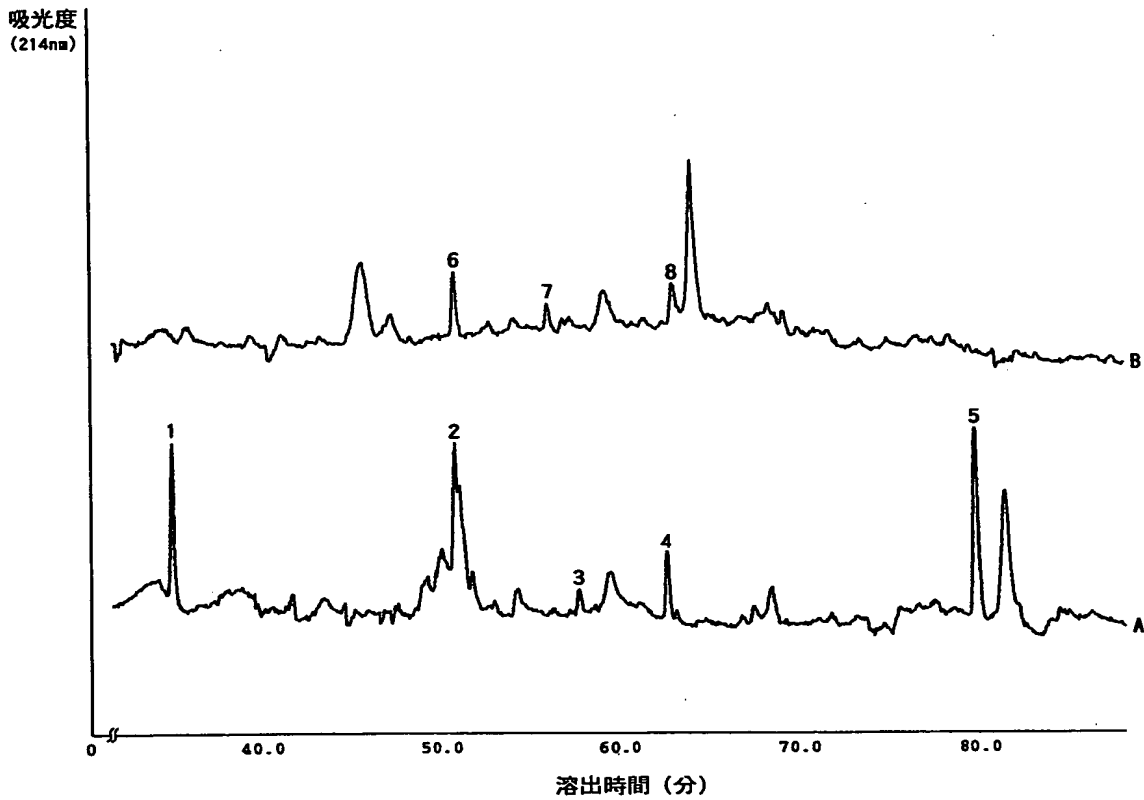
【書類名】 図面

【図 1】



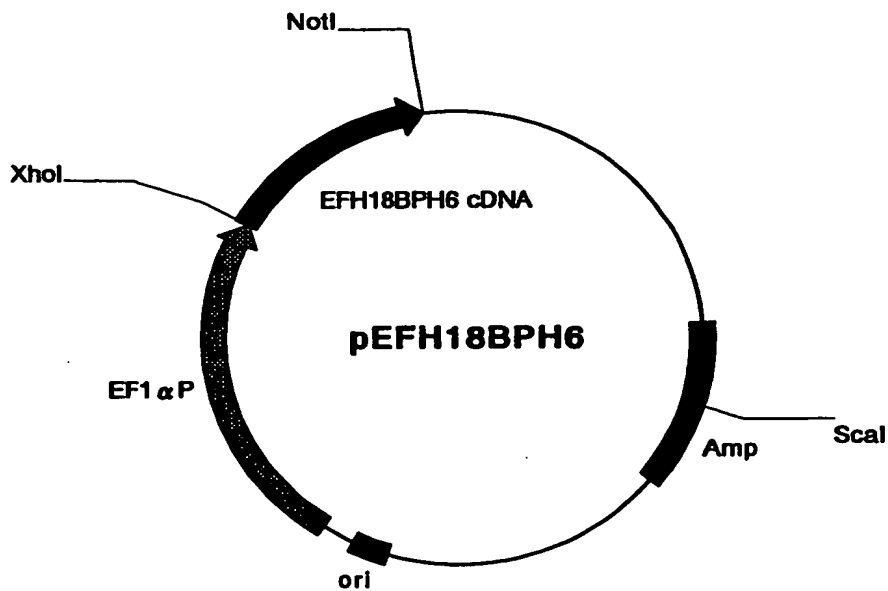
(註) クロマトグラムA及びクロマトグラムBは、それぞれ、トリプシン消化後及びトリプシン/ペプシン消化後に得られたペプチドマップである。図中、1乃至20は、それぞれ、アミノ酸配列を解析したペプチド断片1乃至20の溶出位置を示している。

【図 2】

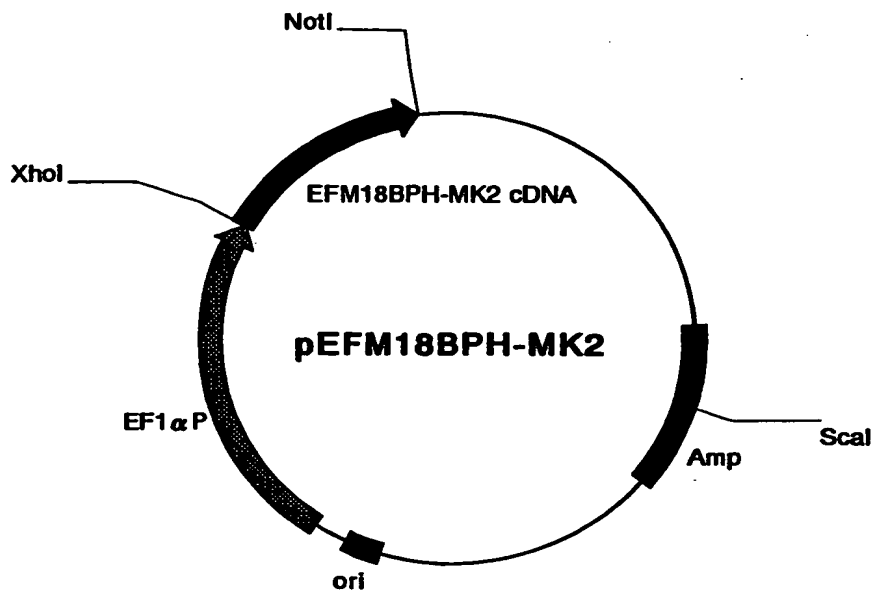


(註) クロマトグラムA及びクロマトグラムBは、それぞれ、トリプシン消化後及びトリプシン/ペプシン消化後に得られたペプチドマップである。図中、1乃至8は、それぞれ、アミノ酸配列を解析したペプチド断片1乃至8の溶出位置を示している。

【図 3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 IL-18に結合することによってその生理作用を抑制する物質とその用途、さらには、その物質をコードするDNAの提供を課題とする。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を含有するIL-18結合蛋白質と、その蛋白質をコードするDNAと、有効成分としてIL-18結合蛋白質を含有するIL-18抑制剤及び抗感受性疾患剤を提供することにより解決する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000155908]

1. 変更年月日	1998年10月21日
[変更理由]	住所変更
住 所	岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
氏 名	株式会社林原生物化学研究所



)

1-5